

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号:

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

BAF57 通过 Wnt 信号通路调控肝癌细胞增殖
及凋亡

BAF57 regulates hepatoma cell proliferation and apoptosis
via the Wnt pathways

许剑锋

指导教师姓名: 王效民 教授

专 业 名 称: 外科学

论文提交日期: 2016-4

论文答辩时间: 2016-5

学位授予日期: 2016-6

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2016 年 6 月

厦门大学博硕士学位论文摘要库

2.5cm		2.5cm
BAS7 通过 Wnt 信号通路调控肝癌细胞增殖及凋亡	指导教师 教授 厦门大学	

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在(厦门大学附属中山医院肝胆外科)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

摘 要	I
ABSTRACT	III
缩略语索引	V
第一部分 BAF57 在肝癌组织中的表达及临床意义	1
引言	1
1.1 实验材料	2
1.2 实验方法	5
1.3 实验结果	12
1.4 实验小结与讨论	16
第二部分 BAF57 促癌机制的体内外研究	18
引言	18
2.1 实验材料	19
2.2 实验方法	22
2.3 实验结果	28
2.4 实验小结与讨论	34
全文总结	37
参考文献	38

Table of Contents

Abstract in Chinese·····	I
Abstract in English·····	III
Abbreviation·····	V
Part1 BAF57 esxpression in HCC and its clinical significance·····	1
Materials·····	2
Methods·····	5
Results·····	12
Conclusion and discussion·····	16
Part 2 Tumor promotion role of BAF57 both in vivo and in vitro·····	18
Materials·····	19
Methods·····	22
Results·····	28
Conclusion and discussion·····	34
Discussion and conclusion·····	37
Reference·····	38

摘 要

背景和目的 肝细胞癌（Hepatocellular carcinoma, HCC）是全球最常见、高发的恶性肿瘤之一，增长快、高转移性高复发已成为影响 HCC 预后的最重要因素。随着技术的发展，研究的深入，很多实验报道肝癌细胞内存在很多的异常蛋白表达或者基因突变，而这些异常点往往可以作为靶向治疗的目标点。随着基因靶向治疗的发展，人们发现一部分癌症确实可以得到良好的治疗，生存期明显延长。我们将继续探索肝癌细胞内存在的可能作为靶向治疗的目标点，同时结合靶向治疗，以突破目前肝细胞癌治疗的极限。以往研究发现 BAF57（Brg-1-associated factor 57）是哺乳动物染色质重组复合小体 SWI/SNF 的一部分。BAF57 在前列腺癌、乳腺癌组织中的表达明显增高，其作用主要是促进癌细胞恶性、增殖及转移。然而 BAF57 在肝癌细胞中的作用及机制并不清楚。本课题将通过体内外研究 BAF57 与肝细胞癌的关系，以及其影响肝癌发生发展的可能机制，为治疗肝癌靶向点提供新的可能和方向。

试验方法 为了了解 BAF57 与肝细胞癌的关系，本课题研究中我们首先通过实时荧光定量 PCR（qPCR）、免疫组化（IHC）、蛋白质免疫印迹实验（WB）研究人肝癌组织细胞内 BAF57 的表达量；然后结合临床标本的病理资料及相关检查统计分析 BAF57 与哪些临床指标相关，同时统计其临床预后。在细胞实验中，我们通过构建敲低 BAF57 稳转细胞系来观察 BAF57 对肝癌细胞恶性及功能的影响，同时利用蛋白质免疫印迹实验（WB）研究敲低 BAF57 影响哪些信号通路。体内实验中我们将构建好的敲低 BAF57 稳转细胞系，经过扩增，打入裸鼠右后背，并记录肿瘤生长趋势，7 周后处死小鼠，观察敲低 BAF57 对肿瘤生长及转移的影响。

研究结果及结论 首先在 51 例临床标本人肝癌组织中 BAF57 的 mRNA 表达水平发现 BAF57 在肝癌内表达的增高，结合临床及病理资料统计发现 BAF57 与肿瘤大小、预后密切相关。免疫组化（IHC）、蛋白质免疫印迹实验（WB）实验中同样证实 BAF57 在肝癌内表达的明显增高。细胞功能实验中，在肝癌细胞系 SMMC-7721 敲低 BAF57 发现能显著抑制了细胞的增殖并促进凋亡，但不能明显抑制肝癌细胞的侵袭和迁移。对分子机制的研究发现，敲低 BAF57 能够

直接增强 GSK 表达水平从而下调了 β -Catenin 的表达，提示可能通过 Wnt/ β -catenin 下游途径影响细胞增殖和凋亡。裸鼠皮下成瘤实验也进一步证实敲低 BAF57 能够抑制肝癌的生长，但不影响肝癌转移。我们的实验结果揭示 BAF57 在肝癌中表达增高及其可能调控肝癌增殖、凋亡的功能，提示 BAF57 可能作为一个潜在的肝癌治疗靶点。

关键词：肝细胞癌；BAF57；GSK； β -Catenin；增殖；凋亡

Abstract

Background and objective Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common and the highest incidence of malignant tumors in the world. The fast growth and high metastatic recurrence has become the most important factors of influencing the prognosis of HCC. With the development of time and technology, many experiments have been reported that there are a lot of abnormal expression or mutation in HCC cells, which can be used as the target point of targeted therapy. And with the development of gene targeted therapy, it is found that some cancers can be treated well, and the survival time is prolonged. We will continue to explore the existence of HCC cells which may serve as the target point of targeted therapy, and combining with targeted therapy, it maybe can exceed the limits of the current treatment of hepatocellular carcinoma. Previous research has found that BAF57 (Brg-1-associated factor 57) as part of the mammalian chromatin reorganization composite corpuscle SWI/SNF. BAF57 is high expression in prostate cancer and breast cancer. The main role is to promote cancer cell proliferation and metastasis. But its mechanism is not clear in the hepatocellular carcinoma. In this study, we will fine the relationship between BAF57 and hepatocellular carcinoma through the task in vitro and in vivo, and the mechanism of the impact of development of HCC, it may provide a new direction to point target as the treatment of hepatocellular carcinoma.

Method In order to understand the relationship between BAF57 and hepatocellular carcinoma, we first studied the expression of BAF57 in human hepatocellular carcinoma (HCC) cells by real-time fluorescence quantitative PCR (qPCR), immunohistochemistry (IHC) and Western blot (WB) in this study. Then combining with the pathological data of clinical specimens and related statistical analysis, it help to fine which clinical indicators related to the BAF57, and fine the statistics of its clinical prognosis. In the cell experiment, we have constructed a downregulation BAF57 stable cell line to observe the effect of BAF57 on the malignant and functional of hepatocellular carcinoma cells. At the same time, using the Western blot experiment (WB) to study the effect of downregulation BAF57 on which signal pathway. In vivo experiments we constructed the stable cell lines, after amplification, injection into the right back of the nude mice, recorded the tumor size every 3 days, 7 weeks after the mices were killed, it help to fine the effect of downregulation BAF57 on the growth

and metastasis of tumor.

Results and conclusion First of all, the mRNA expression level of BAF57 in 51 cases of HCC was found to upregulation of BAF57 in hepatocellular carcinoma tissue. In combination with clinical and pathological data, we found that BAF57 was closely related to tumor size and prognosis. Immunohistochemistry (IHC) and Western blot (WB) experiments also demonstrated significantly increased expression of BAF57 in hepatocellular carcinoma tissue. In cell function experiments, the knockdowned BAF57 of SMMC-7721 HCC cell lines can significantly inhibit the proliferation and promote apoptosis, but it can not inhibit the invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells. In the molecular mechanism study we found that knocking down BAF57 can directly enhance the level of GSK expression and down the expression of beta-Catenin, it suggest that cell proliferation and apoptosis may be affected by the downstream pathway of Wnt/ beta -catenin. Subcutaneous tumor in nude mice also further confirmed that downregulation BAF57 can inhibit the growth of hepatocellular carcinoma, but it does not affect the metastasis of hepatocellular carcinoma. Our experimental results reveal that the upregulation BAF57 expression in hepatocellular carcinoma and its possible regulation of proliferation and apoptosis, suggesting that BAF57 may serve as a potential therapeutic target for hepatocellular carcinoma.

Key words: hepatocellular carcinoma; BAF57; GSK; β -Catenin; proliferation; apoptosis

缩略语索引

英文缩写	英文全名	中文全名
SWI/SNF	(Mating-type switching, SWI)/ (Sucrose non fermenting, SNF)	交换转换型酵母和不发 酵蔗糖
BAF57	Brg-1-associated factor 57	Brg-1 相关因子 57
HCC	Hepatocellular Carcinoma	肝细胞癌
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction	逆转录聚合酶链反应
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链反应
DNA	deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
IHC	Immunohistochemistry	免疫组织化学
qPCR	real time fluorescence quantitative PCR	实时荧光定量聚合酶链 反应
mRNA	messenger Ribonucleic acid	信使 RNA
RNA	ribonucleic acid	核糖核酸
dsDNA	double-stranded DNA	双链 DNA
CDS	coding sequence	编码序列
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	大肠杆菌
dNTP	deoxyribonucleoside triphosphate	脱氧核糖三磷酸
cDNA	complement deoxyribonucleic acid	互补脱氧核糖核酸
shRNA	short hairpin RNA	短发夹 RNA
FBS	Fetal Bovine Serum	胎牛血清
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Media	DMEM 细胞培养基
RNase A	Robonuclease A	核糖核酸酶 A

SSC	saline sodium citrate	柠檬酸钠缓冲液
PVDF	polyvinylidene fluoride	聚偏二氟乙烯膜
PBS	Phosphate Buffered Saline	磷酸盐缓冲液
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride	苯甲基磺酰氟
CCK-8	Cell Counting Kits-8	细胞计数试剂盒 8
TAE	Tris-acetate-EDTA	三羟甲基氨基甲烷-冰乙酸-乙二胺四乙酸
TBST	Tris-Buffered Saline and Tween 20	TBST 洗膜液
RIPA	Radio Immunoprecipitation Assay	放射免疫沉淀分析

第一部分 BAF57 在肝癌组织中的表达及临床意义

引言

肝细胞癌，简称肝癌（hepatocellular carcinoma, HCC），全球恶性肿瘤发病率排名第五，其死亡率排在全部癌症的第二位^[1-2]。每年超过半数的肝癌发生在中国，随着手术技术的发展与进步，对肝癌的诊治已经取得了很大的进步，但是肝癌术后五年生存率仅 20%~30%^[3-4]。主要原因是肝癌术后的病人容易发生复发、转移，且肝癌生长十分迅速^[5]。目前的诊疗方法不能根治肝癌，因此必须研究出新的治疗方法，而分子靶向治疗^[6]是目前新兴的治疗手段，肝癌分子机制研究显得意义重大。

随着研究的发展，目前已经发现多条信号通路有关肝癌分子发病机制，包括 Wnt 信号通路^[7] Hedgehog 信号通路^[8] Notch 信号通路^[9]，MAPK 通路^[10]以及 HGF/c-MET^[11]等信号通路。而索拉非尼(Sorafenib)是目前临床批准用于肝癌晚期的病人，主要是阻断 Raf/MEK/ERK 通路所介导的信号通路^[12]从而达到治疗效果。然而近年来用于肝癌治疗的分子靶向药物研究速度缓慢，主要由于形成肝癌机制的太复杂，且大多数分子靶向药物效率低下，如何找到一个高效的靶点显得尤为重要。

SWI/SNF 全称酵母交换型转换和蔗糖不发酵型染色质重组复合体，是一种保守的多聚酶复合体，可利用 ATP 酶分解 ATP 来改变染色质性状^[13]。很多实验都证明了 SWI/SNF 复合体在基础细胞生命过程有很大的作用，包括转录、复制、修复^[14]。哺乳动物 SWI/SNF 复合体也在不同的病理生理过程中纠缠，包括细胞增殖分化、逆病毒感染以及癌变过程^[15]。基因和生物信息证据证明 SWI/SNF 的基因的产物在啤酒酵母菌基因表达起共同活化剂作用，同时有重组染色质的能力的复合体^[16]。文章报道，SWI/SNF 复合体可以被雄激素招募促进下游的转录激活反应^[17]。SWI/SNF 复合体改变染色体的结构通过它的核心（BRG1 或者 BRM）的 ATP 酶活性，其他构成复合体 8-10 个亚基称作 BRG1 相关因子，即 BAFs^[18]。每个亚基都对整个生命过程都有很大的影响，如 BAF47 等位基因插入突变与神经鞘瘤发生有关^[19]、BAF155 过表达与乳腺癌有关^[20]、BAF250a 突变或缺失与子宫内膜癌相关^[21]

等。

本文所研究的 BAF57/SMARCE1 是 SWI/SNF 复合体 (BRG1 相关因子) 的一个亚基, 其不具有 ATP 酶的活性^[22], 但同样能够影响某些基因的转录以及表达导致肿瘤发生, 如乳腺癌^[23]、前列腺癌^[24]、子宫内膜癌^[25]、卵巢癌^[26]等。BAF57 基因位于 17 号染色体, 编码分子量约为 57kD 的 BAF57 蛋白 (即 SMARCE1), 主要存在于细胞核内^[27]。其机制可能与 BAF57 与雄激素受体结合从而促进前列腺癌细胞增殖^[28], 及 BAF57 能通过 BAF180 结合调节细胞周期等^[29]。但是临床上对这个蛋白在肝癌中的表达情况以及功能意义并不清楚。

本文利用实时荧光定量 PCR (qPCR), 免疫组化 (IHC) 与蛋白免疫印迹实验 (WB) 等实验手段, 分析了 BAF57 在人肝癌组织的表达水平, 结合临床资料以及病理分析, 了解 BAF57 表达水平与临床病理指标及预后的相关性, 为进一步研究肝癌靶向药物提供临床资料。

1.1 实验材料

1.1.1 主要仪器

轮转切片机 (#HM315)	Thermo Scientific 赛默飞世尔
病理学全自动脱水机 (#VIP-5-JR-J2)	樱花医疗集团
组织包埋机 (#TEC-5)	樱花医疗集团
免疫组化染色孵育盒 (#BOX-1001)	迈新生物技术开发有限公司
摊片机 (#FT100)	MEIKO(名幸电子)株式会社
烤片机 (#FT200)	MEIKO(名幸电子)株式会社
高压锅 (#D1822)	爱仕达电器股份有限公司
普通倒置显微镜 (#E100)	尼康 (Nikon,) 公司
冰箱 (#BCD-206SMA)	美的集团
通风橱 (1500*800*2350)	上海名孚通风橱
恒温电热鼓风干燥箱 (#DHG-9146A)	精宏实验设备有限公司
微波炉 (#EG720KG4-NA)	广东美的集团
DNA/RNA 半自动提取仪	Thermo Scientific 赛默飞世尔

生物安全柜（#1300SERIES A2）	Thermo Scientific 赛默飞世尔
实时荧光定量 PCR 仪（#ABI7500）	美国应用生物系统公司
生物样品自动匀质器（TISSUELYSERLT）	QIAGEN 公司
小型 PCR 仪器（Mastercycler gradient）	EPPENDORF 公司
小型离心机（HERAEUS FRESCO21）	Thermo Scientific 赛默飞世尔
-80℃冰箱（#U410-86）	NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC
冰箱（#BCD-215TD）	海尔股份有限公司
移液器	EPPENDORF 公司
微量核酸蛋白测定仪（BIONANO）	赛默飞世尔（Thermo Scientific）
蛋白质垂直电泳系统（Mini-PROTEIN Tetra System）	Bio-rad 公司
电子天平（#BS124S）	赛多利斯（Sartorius AG）集团
超声波组织细胞破碎仪（#VC130PB）	SONIC&MATERIALS.INC 公司
脱色摇床（#WD-9405B）	六一仪器厂
EPPENDORF 离心机（#5804R）	EPPENDORF 公司
超灵敏化学发光成像仪（ImageQuant LAS4000mini）	通用电气公司（General Electric）

1.1.2 主要试剂

多聚酶结合物（#KIT-9922-B）	迈新生物技术开发有限公司
放大剂（鼠/兔）（#KIT-9922-A）	迈新生物技术开发有限公司
鼠抗人 p21 WAF1 蛋白免疫组化单克隆抗体（#MAB-0235）	迈新生物技术开发有限公司
内源性过氧化物酶阻断剂（#SP KIT-A2）	迈新生物技术开发有限公司
PBS 磷酸盐缓冲液（#MVS-0060）	迈新生物技术开发有限公司
抗体稀释液（#ABD-0030）	迈新生物技术开发有限公司
柠檬酸组织抗原修复液（#MVS-0101）	迈新生物技术开发有限公司
抗原修复液 EDTA 法（#MVS-0099）	迈新生物技术开发有限公司
DAB 色原（20×）#0031-C	迈新生物技术开发有限公司

DAB 底物 (20×) #0031-B	迈新生物技术开发有限公司
DAB 缓冲液 (20×) #0031-A	迈新生物技术开发有限公司
二甲苯 (500mL)	(上海) 国药集团化学试剂有限公司
无水乙醇 (500mL)	(上海) 国药集团化学试剂有限公司
苏木素 (200mL)	(上海) 国药集团化学试剂有限公司
福尔马林 (500mL)	(上海) 国药集团化学试剂有限公司
伊红 (200mL)	(上海) 国药集团化学试剂有限公司
盐酸 (500mL)	(上海) 国药集团化学试剂有限公司
DNA-Marker	(大连) 宝生物技术有限公司
总 RNA 抽提试剂盒 Trizol	(大连) 宝生物技术有限公司
反转录扩增cDNA试剂盒	
PrimeScript™RT reagent Kit with gDNA	(大连) 宝生物技术有限公司
Eraser(Perfect Real Time)	
磁珠法通用型 RNA 提取试剂盒 LabServ	赛默飞世尔 (Thermo Scientific)
Cat NO KFR-803096	
高蛋白脱脂奶粉	伊利实业集团股份有限公司
PCR 扩 增 试 剂 SYBR Green II /ROX	(大连) 宝生物技术有限公司
qPCR Master Mix (2×)	
蛋白质电泳 marker (Prestained Protein	赛默飞世尔 (Thermo Scientific)
Ladder, #26616, #26619)	
5×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液	奥博来科技有限责任公司
ECL 显影液	Advansta 公司
RIPA 细胞裂解液 (强, P0013B)	碧云天生物技术 (Beyotime
	Biotechnology)
聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜	Millipore 公司

1.1.3 病理组织标本

由福建省慢性肝病肝癌重点实验室专门提供本实验所需临床组织标本。本实验选用 51 例肝癌组织标本均来自厦门大学附属中山医院肝胆外科, 时间跨度自 2010 年 10 月至 2013 年 9 月, 且经过厦门大学临床研究伦理协会批准。

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.